

**BEEINFLUSSUNG DER
LYMPHOZYTENSTIMULATION IM
TIEREXPERIMENT IN GEGENWART VON
VITAMIN B₆ UND NICOTINSAUREAMID
ALS STRAHLENSCHUTZSUBSTANZEN**

Caritas Kampik

1976

Strahlentherapeutische Klinik, Institut für
Klinische Strahlenbiologie der Universität Wien
Vorstand: Prof.Dr.K.H.Kärcher

Institut für Klinische Chemie,
Kommisarischer Leiter: Prof.Dr.A.Fritz

Labor für Klinische Biochemie,
Leiter: Prof.Dr.K.Hochstraßer, HNO-Klinik
der Universität München

BEEINFLUSSUNG DER LYMPHOZYTENSTIMULATION
IM TIEREXPERIMENT IN GEGENWART VON VITAMIN B₆ UND
NICOTINSÄUREAMID ALS STRAHLENSCHUTZSUBSTANZEN

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Caritas Kampik

aus

Dillingen/Donau

1976

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. K.H.Kärcher

Mitberichterstatter : Prof. Dr. A.Fritz

Dekan : Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14. 12. 1976



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A Einleitung	1
B Fragestellung	2
C PHA-induzierte Lymphozyten-Transformation	3
D Besprechung der Literatur:	
1. Wirkung der Strahlen auf die Lymphozyten	5
2. Vitamin B ₆	8
3. Nicotinsäureamid	12
E Spezielle Fragestellung	17
F Methodik	18
1. Erklärung des Verfahrens der Impuls- cytophotometrie	21
2. Auswertung der Histogramme	22
G Ergebnisse	25
H Diskussion	31
I Zusammenfassung	35
J Literaturverzeichnis	37



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553820_0030

A EINLEITUNG

Die Lymphozyten, potentielle Träger der Immunabwehr, sind die strahlensensibelsten Zellen unseres Körpers. In der Strahlentherapie bei Tumorpatienten werden auch die regionären Lymphknoten bestrahlt, die zur Filterung maligner Zellen dienen. Dabei werden ein großer Teil der Lymphozyten geschädigt, deren Aufgabe es eigentlich ist, auf einen Antigenreiz hin, z.B. ein Tumorantigen, die Herstellung von Antikörpern einzuleiten. Es kommt dabei zu einem initialen Lymphozytensturz 24 Std. post radiationem (p.r.) (1); 12 Wochen nach der Bestrahlung ist die absolute Lymphozytenzahl jedoch schon wieder erreicht.

Bedeutender ist, daß die eigentliche Funktionstüchtigkeit der Lymphozyten durch direkte Strahlenwirkung auf die DNS noch bis zu 1 Jahr nach Bestrahlung beeinträchtigt ist. (Millard 1965)

Durch die Wirkung ionisierender Strahlen wird somit ein System gestört, das selbst größere Verbände malignisierter Zellen noch mit Hilfe dieser körpereigenen Abwehr abtötet oder zumindest an der weiteren Ausbreitung hindert.

B FRAGESTELLUNG

In meiner Arbeit teste ich 2 Vitamine:
Vitamin B₆ und Nicotinsäureamid, die auf die
Lymphozytenfunktion möglicherweise einen strahlen-
schützenden Effekt ausüben.

In den letzten Jahren sind zahlreiche Versuche
durchgeführt worden (2), (3), (4), die sich mit der
Strahlenwirkung auf periphere Lymphozyten beschäf-
tigen. In erster Linie zum Studium der Wirkung auf
den Zellzyklus und zur Erforschung strahlenindu-
zierter immunologischer Veränderungen. Dabei wurde
eine Methode zur Messung der Funktionstüchtigkeit
der bestrahlten Lymphozyten entwickelt, nämlich
die Stimulierung mit dem unspezifisch wirkenden
Antigenstimulus Phythämagglutinin (PHA). Als Maß
für die Strahlenwirkung dient die Stimulierbarkeit
durch PHA.

Diese wurde in meiner Arbeit nicht mit der üblichen
autoradiographischen Meßmethode bestimmt, sondern
mit der von Dittrich und Göhde (1969) entwickelten
Impulszytophotometrie (ICP). Das Grundprinzip liegt
bei dieser neu entwickelten Methode in der Erkennung
des DNS-Gehalts durch Anfärben mit fluoreszierenden
Substanzen. Die Mengenbestimmung der DNS pro Zelle
erfolgt dabei durch Messung der Fluoreszenzlicht-
intensität. (Göhde 1970)

C PHA - INDUZIERT LYMFOZYTEN-TRANSFORMATION

Die Lymfozyten haben die Fähigkeit, sich in die verschiedenen Zellen, die für eine Immunreaktion verantwortlich sind, zu verwandeln. In vitro kann man eine Stimulierung durch Phythämagglutinin - ein mitogenes Extrakt aus der Pferdebohne Phaseolus - hervorrufen. Während der Inkubation mit PHA bei 37° C transformieren sich die Lymfozyten in blastenartige Zellen: die Immunoblasten. (4) Diese vermehren sich später und differenzieren sich in Plasmazellen, welche die Antikörper synthetisieren. Die Stimulation der Lymfozyten in vitro erfolgt auf einer Interaktion zwischen PHA und Rezeptoren an der Zelloberfläche. (2)

Die Kerne der transformierten Zellen vergrößern sich, haben deutliche Nukleolen. Eine ausgeprägte Basophilie läßt sich nachweisen. Elektronenoptisch haben diese Zellen im Vergleich zu Lymfozyten eine größere Zahl an Mitochondrien, reichlich zytoplasmatische Ribosomen und einen hoch entwickelten Golgiapparat. (3)

Aufgrund von autoradiographischen Messungen, die über die Teilungsaktivität der transformierten Zellen Aufschluß geben, konnte nachgewiesen werden, daß die Lymfozyten nach 36 Std. beginnen DNS zu

bilden, und nach 48 - 72 Std. wird dann die in Schüben ablaufende mitotische Aktivität sehr deutlich. (5 und 6)

Eine halbe Stunde nach PHA-Zugabe findet ein rascher Abbau des RNS-Materials statt. Eine Stunde später ist dann eine Steigerung der RNS-Synthese nachweisbar, (7) und vier Stunden danach setzt die Proteinsynthese ein. (8)

Die RNS-Synthese läßt sich unter vergleichbaren Bedingungen nur in 5 % - 10 % bei ruhenden Lymphozyten nachweisen. (9)

D BESPRECHUNG DER LITERATUR

1. Wirkung der Strahlen auf die Lymphozyten

Für die große Strahlenempfindlichkeit des lymphatischen Systems ist wahrscheinlich der hohe Gehalt an Nukleinsäuren maßgebend. (1) Dabei ist interessant, daß die stimulierten Lymphozyten ($D_0 = 250$ rd) eine erhöhte Strahlenresistenz zeigen gegenüber den strahlensensitiven peripheren kleinen Lymphozyten ($D_0 = 20$ rd). Die erhöhte Strahlenresistenz läßt sich sowohl für die in Plasmazellen (11), als auch für die in Lymphoblasten transformierten Lymphozyten (12), sowie für die mit PHA stimulierten Lymphozyten (13) nachweisen.

Strahlenchemische Untersuchungen haben ergeben, daß einige Stunden nach Bestrahlung in den Lymphozyten ein Abbau der DNS beginnt, mit dem eine Hemmung der DNS-Synthese und der Proteinsynthese einhergeht. (17) Außerdem treten unter denselben Bedingungen eine Reihe weiterer biochemischer Veränderungen ein. So steigen die Aktivitäten hydrolytischer Enzyme p.r. stark an, die oxydative Phosphorylierung in den Mitochondrien und der Gehalt an Pyridinnukleotiden nehmen ab. (18, 19)

Der aktive Transport der Nukleinsäure-Basen und Aminosäuren ist ebenfalls geschädigt. Die primären Veränderungen nach Bestrahlung sind jedoch noch ungeklärt.

Nach Ganzkörperbestrahlung beobachtet man als eine der ersten Reaktionen die Abnahme der Lymphozyten im Blut. So konnte Cronkite (15) nach extrakorporaler Bestrahlung bei Schweinen und Hunden einen sofortigen und anhaltenden Abfall der absoluten Lymphozytenzahl feststellen.

In einer Arbeit von Zak und Dienstbier (16) erwies sich ebenso nach einer einmaligen Dosis von 25 rd eine kurzzeitige Abnahme der absoluten Lymphozytenzahl, die aber dann zu einem kontinuierlichen Anstieg über die Norm hinaus führte. Diese Aussagen beziehen sich aber nur auf die Lymphopoese, nicht aber auf die Funktionsfähigkeit, nämlich auf einen Antigenstimulus hin eine Mitose einzuleiten, zur Umwandlung in einen Immunoblasten.

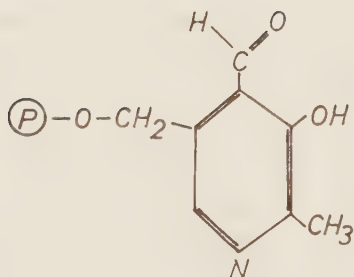
Madl und Kärcher (14) führten nun eine Untersuchung über die Funktionstüchtigkeit der peripheren Lymphozyten durch, während und im Anschluß an die Nachbestrahlung Mammakarzinom operierter Patientinnen, also während der Phase der absoluten Lymphopenie,

bzw. während des Anstiegs auf normale Werte. Die Patientinnen erhielten eine Gesamtdosis von 4000 - 5000 rd. Das Verhalten der PHA-stimulierten Lymphozyten zeigte spätestens 3 Wochen nach Bestrahlungsbeginn eine hochsignifikante Abnahme des Tritiumthymidineinbaus. Parallel dazu ging anfangs ein Abfall der absoluten Lymphozytenzahl einher, der gegen Ende der Bestrahlung (ca. 3 Monate) beinahe den Ausgangswert erreichte.

Der Tritiumthymidineinbau lag dagegen noch tief unter den Ausgangswerten. Daraus folgt, daß eine Störung der Lymphozytenfunktion anzunehmen ist. Damit ist verbunden, daß "die bei Tumorpatienten bestehende defekte Immunitätslage weiterhin im negativen Sinn gestört wird." (23) Die nur noch schwach vorhandene eigene Körperabwehr wird also durch die Strahlentherapie aus dem Gleichgewicht gebracht.

In dieser Arbeit teste ich Vitamin B₆ und Nicotinsäureamid im Hinblick auf eine strahlenschützende Wirkung, die die gestörte Funktionsfähigkeit des Lymphozyten wieder herstellen soll.

2. VITAMIN B₆



Während der akuten Strahlenkrankheit von Säugtieren treten biochemische und pathophysiologische Veränderungen auf, die in ähnlicher Form bei Vitamin B₆-Mangelsyndrom beobachtet werden. (21) Das zeigt deutlich, daß Veränderungen des Stoffwechsels für die Entwicklung des Strahlenschadens mit-verantwortlich sein müssen. (17)

Als Beispiele seien einige wesentliche Symptome genannt, die sowohl beim Vit.B₆-Mangelsyndrom, als auch während der akuten Strahlenkrankheit auftreten:

- Schädigung der DNS-, RNS- und Protein-Biosynthese in lymphatischen Organen.
- Hemmung der Antikörper-Synthese;
- Auftreten einer Lymphopenie, sowie Atrophie des Thymus und der Milz. (21)

Vitamin B₆ (Pyridoxin) geht im Organismus in die phosphorylierte Form über. Es entsteht das Coenzym Pyridoxal-5-Phosphat (PALP). PALP spielt im Organismus als Coferment der decarboxylierenden, transaminierenden und desulfurierenden Enzyme für praktisch alle nicht oxydativen Veränderungen, denen die Aminosäuren im Stoffwechsel unterliegen eine wichtige Rolle.

Aus strahlenchemischen Untersuchungen von Nakken (22) geht hervor, daß das Coenzym PALP in wäßriger Lösung gegenüber ionisierenden Strahlen sehr empfindlich ist. Langendorff und Mitarb. (23) kommt ebenfalls in einer "Untersuchung über einen biologischen Strahlenschutz" zu dem Schluß, daß der "Störung des PALP-Systems eine wesentliche Bedeutung für die Ausprägung der strahlenbedingten Veränderungen im Aminosäurestoffwechsel zukommt." Die strahleninduzierten Veränderungen sind aber nicht auf einen Mangel an PALP zurückzuführen. Mac Farland (24) konnte das durch die Gabe einer Pyridoxin-Mangelkost bei Ratten nachweisen. Es wird angenommen, daß "die Funktionsfähigkeit der Regulation, an der das Coenzym offenbar beteiligt ist, durch die Bestrahlung gestört wird." (17, 25)

In zahlreichen Untersuchungen wurde nun eine protektive Wirkung auf verschiedene biologische Funktionen gegenüber der Strahlenwirkung überprüft. Die Beobachtung, daß durch eine Gabe von Vitamin B₆ die Frühsymptome der Strahlenkrankheit günstig beeinflußt werden, führte zu einer erfolgreichen Anwendung des Vit.B₆ in der Klinik, vor allem bei den durch strahlentherapeutische Maßnahmen ausgelösten Allgemeinerscheinungen. (26, 27)

Silvermann u. Mitarb. (28) konnten dagegen bei klinischen Untersuchungen unter Verwendung von Blindversuchen, bei Patienten, die einer Tiefentherapie unterzogen waren, keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit und Schwere der Symptome des Strahlenkraters in den einzelnen Patientengruppen, die 25 mg Pyridoxin und 50 mg Dramamin oder Milchzucker erhielten, beobachten.

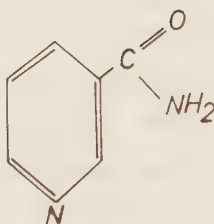
Auch tierexperimentelle Untersuchungen ergaben keine übereinstimmenden Ergebnisse. Die schützende Wirkung von Vit.B₆ im LD₅₀-Bereich kommt in den Untersuchungen von Goldfeder deutlich zum Ausdruck. (29) Langendorff u. Mitarb. (30, 31, 23) berichten in einer Reihe von Arbeiten ebenfalls von einem protektiven Effekt, vor allem bei Kombination des PALP mit 5-Hydroxytryptamin und ATP.

Im Gegensatz dazu steht die Arbeit von Bridge und Koch (32), wo keine Schutzwirkung des Vitamins gefunden werden konnte.

Über die Wirksamkeit des Vit.B₆ speziell bei strahleninduzierten Blutbildschädigungen gibt es in der Literatur nur wenige Angaben. (33, 34) Del Buono (35) und Jamada u. Mitarb. (36) berichten über eine Verringerung der Leukopenie, wenn den Tieren vor der Bestrahlung Pyridoxin gegeben wurde. Hartweg und Böwing (37) konnten dagegen die Leukopenie durch Pyridoxingaben vor der Bestrahlung nicht beeinflussen.

Die Ergebnisse weiterer Tierversuche waren ebenfalls uneinheitlich. (38, 39, 40)

3. NICOTINSÄUREAMID



Die wasserübertragenden Enzyme der Gärung, der Glykolyse und vieler anderer Reaktionen, enthalten als prosthetische Gruppe Dinukleotide, deren Base ein Pyridinderivat, das Nicotinsäureamid (NSA) ist. So ist NSA als Bestandteil von den Coenzymen Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) und Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) in allen Geweben des Organismus vertreten. Die Pyridinnucleotide stehen in naher Beziehung zu einem Vitamin der B-Gruppe, der Nikotinsäure, dessen Amid, das Nikotinsäureamid, ebenfalls als Vitamin wirksam ist. Es ist die Form des Vitamins die in das Coenzym eingebaut ist. (41)

Mangel an diesem Vitamin führt zur Abnahme der Konzentration von NAD^+ und NADPH vorwiegend in der Leber und Muskulatur, während in Blut, Herz und Niere die Konzentrationen meistens im Normbereich

bleiben. Der Abbau des NAD^+ erfolgt durch die NAD^+ -Glycohydrolase unter Abspaltung von NSA.

Untersuchungen von Koch und Mitarb. (42) haben gezeigt, daß die Erhaltung einer bestimmten stationären NAD^+ Konzentration für die bestrahlte Tumorzelle offenbar ein locus minoris resistentiae ist.

Auch aus Arbeiten von Maass u. Mitarb. (43) geht hervor, daß nach einer Bestrahlung von Yoshida-Ascites Sarkomzellen mit einigen kR der NAD^+ -Gehalt in den Tumorzellen abfällt. Hilz u. Mitarb. (44) haben die Ursache für diesen Strahleneffekt untersucht.

15 min. bis 3 Std. nach einer Röntgenstrahledosis von 4 kR wird das NAD^+ durch die Asciteszellen vermehrt zu NSA abgebaut. Die Autoren nehmen an, daß durch die ionisierenden Strahlen primär die Zellmembran betroffen wird und damit NSA aus den Zellen in das Medium übertreten kann. Da das Amid die NAD^+ -Glycohydrolase intrazellulär hemmt, hat dieser Strahleneffekt den erhöhten Abbau des NAD^+ zur Folge. (45)

Interessant ist auch, daß die glykolytische Aktivität und der Gehalt an NAD^+ in den Yoshida-Ascites Sarkomzellen parallel zueinander verlaufen. Man nimmt an, daß der strahlenbedingte Abfall des

NAD^+ -Gehaltes die Erniedrigung der Glykolyse verursacht, da der Elektronenakzeptor NAD^+ bei der Dehydrierung des Phosphoglycerinaldehyds nicht in ausreichendem Maß vorhanden ist. (46)

Es stellt sich nun die entscheidende Frage, ob die Wirkung des NSA wirklich so spezifisch für das Tumorgewebe ist. Das wäre für den Strahlentherapeuten von großem Interesse, denn es hätte sich ein strahlensensibles Stoffwechselgeschehen herausgestellt, das die Tumorzelle deutlich von der Normalzelle trennt.

Koch und Seiter (47) prüften daher ob NSA eine Strahlenschutzsubstanz, sowohl am Tumor als auch am Normalgewebe darstellt. Es ergab sich, daß NSA am in vitro bestrahlten Ehrlich-Ascites-Tumor strahlenschützende Eigenschaften besitzt. Dagegen zeigte sich kein Schutzeffekt, wenn Mäuse kurz vor einer Ganzkörperbestrahlung NSA erhielten.

NSA ist also für Tumorgewebe ein Strahlenschutzstoff, nicht aber für Normalgewebe. Daraus wird die Bedeutung eines adäquanten (intrazellulären) Nicotinsäureamidspiegels für den generellen Stoffwechsel der Tumorzelle sehr deutlich.

Hilz und Berendt (44) nehmen sogar an, daß die strahleninduzierte Schädigung der DNS-Synthese bei Zusatz von NSA weitgehend wieder rückgängig gemacht werden kann. Die Autoren vermuten, daß das "nur dann erklärlich ist, wenn man dem NSA die Fähigkeit zuschreibt, zumindest den größten Teil der Zellen, die nach der Bestrahlung überhaupt keine DNS mehr bilden, wieder zur Synthese anzuregen." Diese Folgerung wird von ihnen auch experimentell belegt. Demnach bewirkt NSA-Zusatz bei bestrahlten Zellen Normalisierung der DNS-Synthese in jeder Beziehung. Es erhöht in den bestrahlten Ansätzen nicht nur die Anzahl der aktiv synthetisierenden Zellen, sondern auch die Intensität der DNS-Synthese.

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß unter NSA der allgemeine Stoffwechsel, das Wachstum der bestrahlten Tumorzellen beschleunigt wird.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß der Gehalt an Pyridinnukleotiden (NAD^+ , NADH , NADP , und NADPH) auch in lymphatischen Geweben nach Bestrahlung abnimmt. (48, 49, 50)
So zeigte Scaife (49), daß der Abfall des NAD^+ -Gehaltes in bestrahlten Thymozyten nach Zugabe von NSA verhindert werden konnte.

Whitefield und Mitarb. (50) erbrachten sogar den Beweis, daß NSA, das einer Thymozyten-Kultur innerhalb von 2 Stunden nach Bestrahlung zugesetzt wird, die postradiologische Entwicklung zytologischer Symptome wie Kernschäden und Zelltod verzögert oder sogar verhindert. Diese Befunde widerlegen die These obengenannter Autoren, daß NSA allein Strahlenschutzstoff für bestrahlte Tumorzellen sei.

E SPEZIELLE FRAGESTELLUNG

Bei der therapeutischen Strahlenanwendung ist eine Mitbestrahlung der blutbildenden Organe unvermeidlich, sodaß Blutbildveränderungen bis zu einem gewissen Grad hingenommen werden müssen.

Besondere Bedeutung hat die Lymphozyten-Stimulierbarkeit, deren Beeinträchtigung von Madl und Kärcher (14) noch 6 Monate p.r. festgestellt werden konnte.

In dieser Arbeit wird nun untersucht, ob eine Beeinflussung der Lymphozyten-Stimulierbarkeit in Anwesenheit von Vitamin B₆ und Nicotinsäureamid als Strahlenschutzstoffe möglich ist.

F METHODIK

Es wurden insgesamt 90 jugendliche, weiße weibliche "Sprague-Dowley" Ratten von 200 - 250 g verwendet. Alle Tiere erhielten eine einmalige Ganzkörperbestrahlung von 100 rd.

Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt:

- 1) 30 Kontrolltiere, die nur die Bestrahlung erhielten und physiol. NaCl gespritzt bekamen.
 - 2) 30 Tiere, die zusätzlich 30 Minuten vor der Bestrahlung und danach täglich über 14 Tage eine s.c. Injektion von Vitamin B₆ in einer Dosis von 40 mg/kg entsprechend der 10-fachen täglichen Humandosis von Vit. B₆ (200 mg/Tag/Pers.) erhielten.
 - 3) 30 Tiere, die zusätzlich 30 Minuten vor der Bestrahlung und danach täglich über 14 Tage eine s.c. Injektion von Nicotinsäure in einer Dosis von 40 mg/kg entsprechend der 10-fachen täglichen Humandosis von Nicotinsäure (200 mg/Tag/Pers.) erhielten.
- (Die Substanzen wurden uns freundlicherweise von der Firma GEROT, WIEN zur Verfügung gestellt).

Die Tiere wurden in einer Co 60 Anlage bestrahlt und zwar mit einer Dosisleistung von 0,74 Mrd/h, in der

Zentralposition, mit Fricke ausdosimetriert.
Dies entspricht einer 100 rd Ganzkörperbestrahlung
in 1 m Entfernung von der Konfiguration.

Innerhalb einer Gruppe wurden jeweils 10 Tiere
1 - 2 Stunden, 14 Tage bzw. 28 Tage nach der Be-
strahlung mit Äther narkotisiert, laparatomisiert
und durch Eröffnen der vena cava inferior und
der aorta abdominalis entblutet. Zur Vermeidung
einer Koagulation wurde vorher 0,3 ml Liquemin
der Firma Roche direkt in die vena cava inferior
injiziert. Das weitere Vorgehen dient der Gewinnung
der Lymphozyten aus dem Blut durch Trennung der
Blutzellen auf Grund ihrer unterschiedlichen spezi-
fischen Gewichte nach der Methode von Yan de Vries
et. al (51) bzw. Wottawa, Klein und Altmann (1974)
(52), bei der verdünntes, heparinisiertes Blut mit
einer Lösung aus "Ficoll" (Pharmazia Uppsala,
Schweden) und "Urografin" (Schering AG., Berlin)
unterschichtet und 20 Min. bei 2000 U/min zentri-
fugiert wird. Da das spezifische Gewicht dieser
Lösung über dem der Lymphozyten liegt, setzen sich
diese als schmale weiße Bande an der Grenze von
Zentrifugierlösung und Plasma ab, während sich die
restlichen Blutzellen am Boden des Röhrchens befin-
den. Nach der Zentrifugation wurden die Lymphozyten
mit einer Pipette abgehoben, zwei- bis dreimal in

physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in zwei gleiche Hälften aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde in 96 %igem Äthylalkohol fixiert, die andere in 10 ml Parkermedium 199 (mit Antibiotika- und Kälberserum-Zusatz) suspendiert. In diese Probe wurde 0,2 ml PHA gegeben, wodurch die Stimulierung eingeleitet wurde, die 72 Stunden bei 37° C erfolgte. Danach wurden auch diese Zellen in Alkohol fixiert. Anschließend begann die Vorbereitung der Messung der DNA-Menge in den einzelnen Lymphozyten mit Hilfe der Impulscytophotometrie. Dazu ist die Fluor-chromierung der Zellen mit Ethidiumbromid (2,7 Diamino-10-äthyl-9-phenyl-phenaritrudinumbromid) notwendig. Dieser Farbstoff bindet sich selektiv an zweisträngige Nukleinsäuren, welche die Form einer Doppelhelix im Sinne des Watson-Crick-Modells aufweisen, wobei sich seine Fluoreszenzeigenschaften erheblich verbessern. In sehr guter Näherung ergibt sich eine Proportionalität zwischen DNA-Gehalt, entsprechend der Ploidiestufe und der Fluoreszenzintensität. (53)

Um jede extranukleare Komponente der Fluoreszenz auszuschalten, wurde das Zellplasma durch schonende Proteolyse mit Pepsin (0,5 g Pepsin 1000 E/g in 100 ml 0,2 % HCl) verdaut, wonach nur noch die

Zellkerne in der Suspension verbleiben. Erst nach dieser Vorbehandlung wurden die Zellkerne fluorchromiert (5 mg/1000 ml Ttis-Puffer pH 7,5).

1. ERKLÄRUNG DES VERFAHRENS DER IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

(Dittrich und Göhde, seit 1969)

Das Maß der Proliferationsaktivität von Zellen ist der Anteil von Zellen mit erhöhtem DNS-Gehalt.

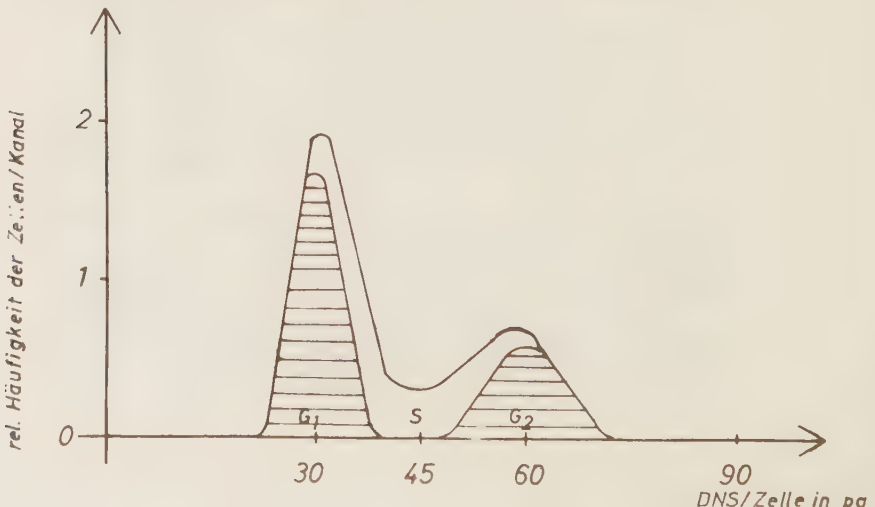
(Zellen mit diploidem Chromosomensatz in der Ruhepause werden "G₁-Phase-Zellen" genannt. Zellen im Stadium der DNS-Synthese mit Verdoppelung der DNS-Menge sind "S-Phase-Zellen", worauf sich die "G₂-Phase-Zellen" mit diploidem Chromosomensatz vor der Mitose anschließen).

Die Impulscytophotometrie automatisiert den Transport der fluorchromierten und suspendierten Zellen durch den Tiefenschärfenbereich eines Mikroskop-Photometers, indem die Suspension angesaugt und durch die Austrittsöffnung einer engen Röhre geführt wird. Diese Öffnung stellt das Meßfeld dar, welches die Zellen nacheinander parallel zur optischen Achse mit 3 mm/sec durchlaufen. Jede Zelle sendet nach Anregung des Farbstoffes ein Fluoreszenzlichtsignal aus, welches in seiner Amplitude der DNS-Menge der Zelle proportional ist.

Die von einem Photomultiplier empfangenen Lichtsignale werden von einem Vielkanalanalysator einer von 128 Größenklassen zugeordnet, und gleichzeitig wird die Häufigkeit der Signale pro Größenklasse-Kanal gespeichert. So entstehen am Ende der Gesamtmessung im Speicher 128 Einzelwerte, welche die Signalzahl in jedem Kanal angeben und die anschließend als Koordinaten eines Histogramms, also einer DNS-Mengenverteilung, ausgeschrieben werden.

2. AUSWERTUNGSMETHODIK DER HISTOGRAMME

Von den Lymphozyten jeden Tieres wurden also zwei Histogramme erstellt, entsprechend der unterschiedlichen Behandlung. Eines, welches nur die Wirkung der Bestrahlung nach 0, 14 und 28 Tagen zeigt und eines das den zusätzlichen Stimulierungseffekt derselben Lymphozytenpopulation durch PHA wiedergibt.



Bei der Auswertung eines Kurvenpaares wurde von der Kurve "unstimuliert" ausgegangen:

Zuerst wurde der Kanal des meist deutlich sichtbaren G_1 -Maximum bestimmt (z.B. 30). Davon ausgehend ist die doppelte Kanalzahl = G_2 -Maximum (z.B. 60) und genau zwischen diesen beiden das S-Maximum (z.B. 45).

So ergaben sich drei Kanäle, die als Mitte der jeweiligen Phase des Zellzyklus anzusehen sind. Jeder dieser drei Kanäle wurde zu einer Bande erweitert, die den Bereich von 10 Kanälen umfaßt, in dem, ausgehend vom Maximum-Kanal, die jeweils 5 höheren und niederen Kanäle bestimmt wurden (z.B. G_1 -Phase 25 - 35, S-Phase 40 - 50, G_2 -Phase 55 - 65). Dieser Bereich unter der Kurve wurde als charakteristisch für die Phase angesehen. Unter dem jeweiligen Kurvenabschnitt wurde die Fläche planimetrisch bestimmt.

Da die Amplitude der verschiedenen Histogramme von der gemessenen Zahl abhängt, bot sich die Auswertung an durch Vergleich der prozentualen Anteile der Einzelphasen am Zellzyklus. Die Flächen unter den drei Kurvenabschnitten wurden gleich 100 % gesetzt und die prozentualen Anteile der G_1 -, S- und G_2 -Phase berechnet.

Die Entscheidung beim Vergleich der Anteile wurde mit Hilfe von folgendem statistischen Testverfahren getroffen:

U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney. (54)

Der Test wurde an der II. Med. Universitätsklinik München durchgeführt, auf einer Siemens-Rechenanlage 404/3 mit 64 k-Byte-Kernspeicher. Die statistische Betreuung hatte cand. med. et math. R.Herndl.

G ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der unstimulierten Zellen wurden mit "-" gekennzeichnet, und die der PHA stimulierten mit "+".

Die Differenz der prozentualen Anteile der Phasen von "-" und "+" wurden rechts neben die Ergebnisse aufgezeichnet. Sie stellen das Maß der Stimulierbarkeit dar.

Unter den Differenzen von Nicotinsäureamid und dem Vitamin B₆ steht der prozentuale Vergleich der Differenzen zu den Kontrollwerten, aus denen bei Signifikanz eine Wirkung der Substanzen hervorgeht.

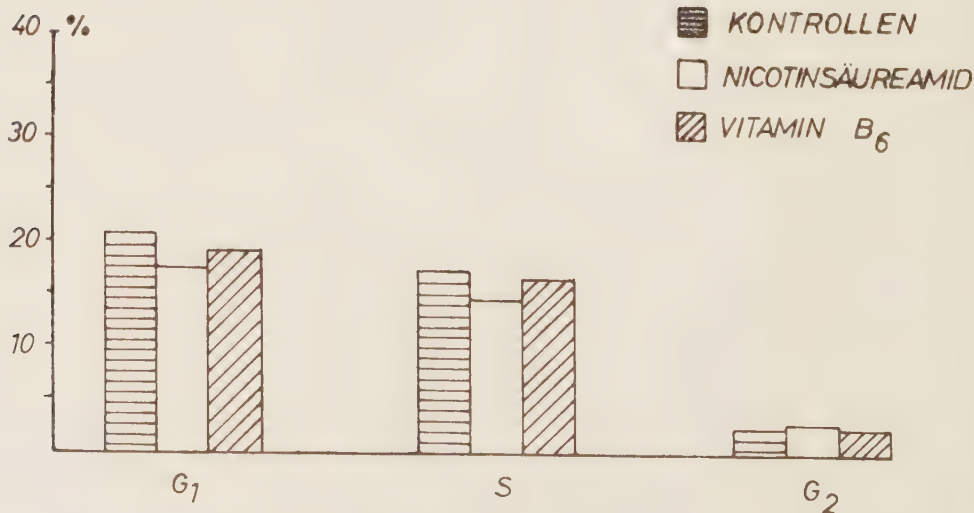
1 - 2 Stunden

Kontrollen			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 94,1	3,7	2,2			
+ 74,1	21,1	4,8	20,0	17,4	2,6

Nicotinsäureamid			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 94,2	3,5	2,3			
+ 76,7	18,1	5,2	17,5	14,6	2,9
			- 2,5	- 2,8	+ 0,3

Vitamin B ₆			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 94,2	2,4	3,4			
+ 74,9	18,9	6,2	19,3	16,5	2,8
			- 0,7	- 0,9	+ 0,2

STIMULIERBARKEIT



Prozentualer Vergleich der Differenzen: 1 - 2 Stunden

14 Tage

Kontrollen			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 93,5	4,2	2,3			
+ 80,7	13,7	5,6	12,8	9,5	3,3

Nicotinsäureamid			Differenzen "-" gegen "+"		
- 96,1	2,1	1,8			
+ 81,5	14,8	3,7	14,6 + 1,8	12,7 + 3,2	1,9 - 1,4

Vitamin B ₆			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 93,6	4,9	1,5			
+ 76,7	20,7	2,6	16,9 + 4,1	15,8 + 6,7	1,1 - 2,1

STIMULIERBARKEIT

40 %

30

20

10

 KONTROLLEN
 NICOTINSÄUREAMID
 VITAMIN B₆

G₁

S

G₂

Prozentualer Vergleich der Differenzen: 14 Tage

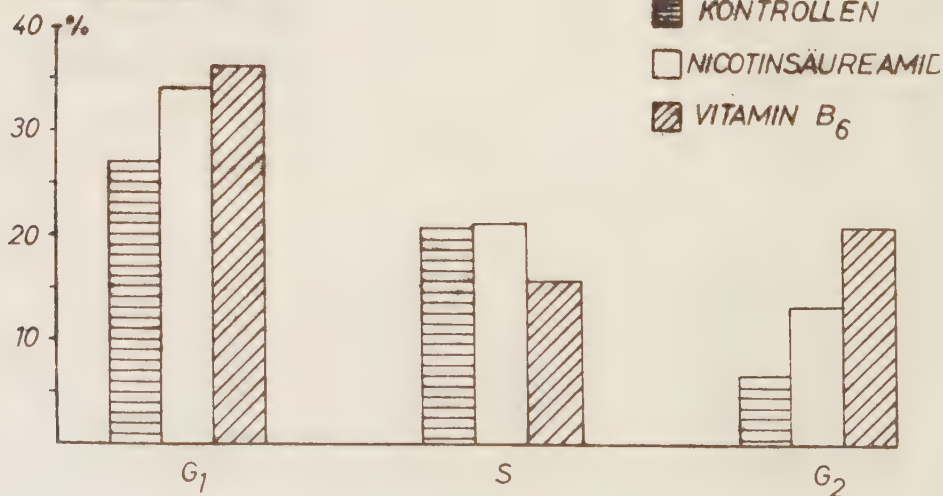
28 Tage

Kontrollen			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 90,2	4,4	5,4			
+ 62,9	25,0	12,1	27,3	20,6	6,7

Nicotinsäureamid			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 98,3	1,1	0,6	34,3	21,0	13,3
+ 64,0	22,1	13,9	+ 7,0	+ 0,4	+ 6,6

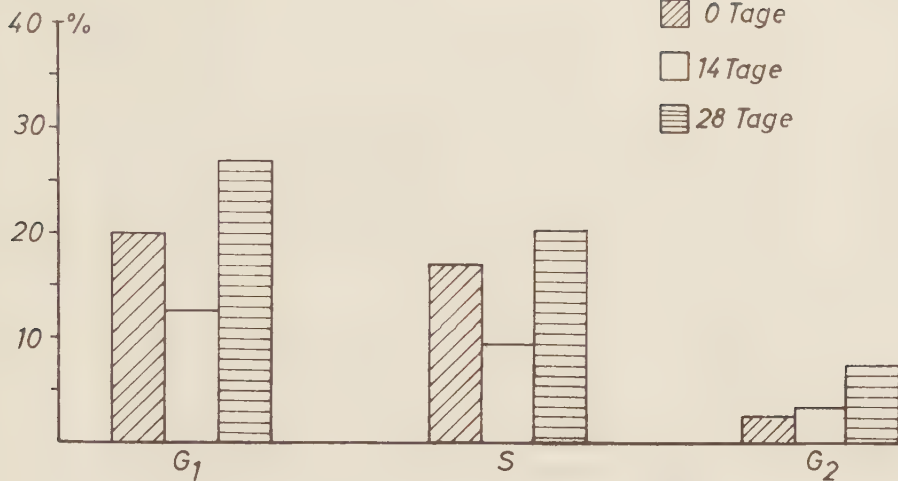
Vitamin B ₆			Differenzen "-" gegen "+"		
G ₁ %	S %	G ₂ %	G ₁ %	S %	G ₂ %
- 97,6	1,2	1,2	36,1	15,6	20,5
+ 61,5	16,8	21,7	+ 8,8	- 5,0	+ 13,8

STIMULIERBARKEIT



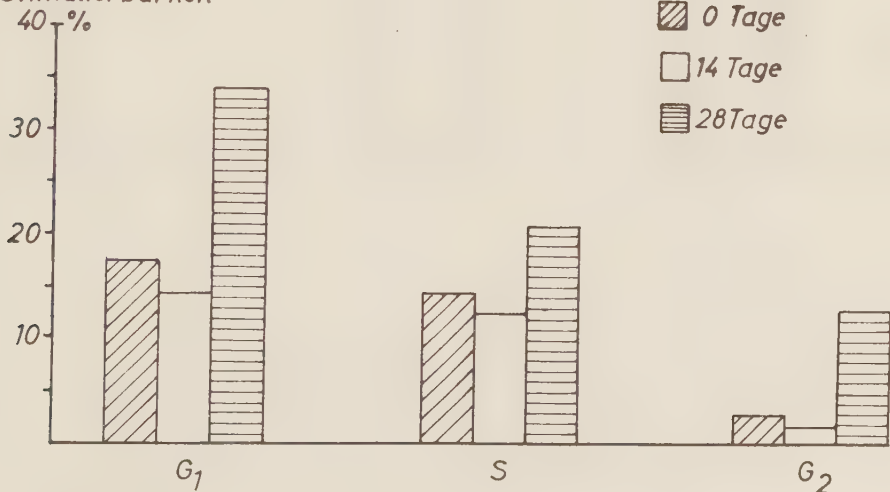
Prozentualer Vergleich der Differenzen: 28 Tage

Stimulierbarkeit

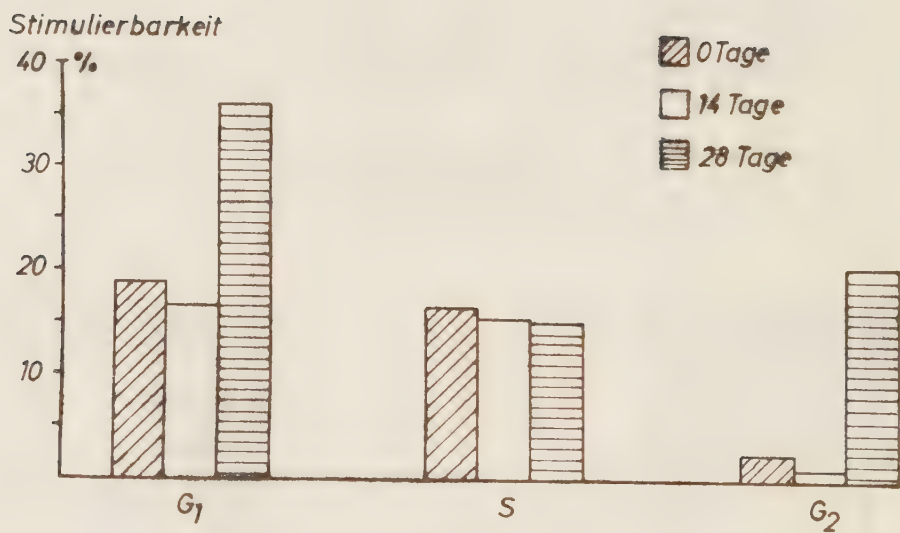


Prozentualer Verlauf der KONTROLLEN über 0, 14, 28 Tage

Stimulierbarkeit



Prozentualer Verlauf von NICOTINSÄUREAMID über 0, 14, 28 Tage



Prozentualer Verlauf von VITAMIN B₆ über 0, 14, 28 Tage

H DISKUSSION

Entscheidend ist in dieser Arbeit die Frage nach der Beeinflussung der Substanzen Vitamin B₆ und Nicotinsäureamid auf die Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten im Hinblick auf eine Tumorstrahlentherapie.

Bei dem Kollektiv der Lymphozyten die nach 0 Tagen aus dem mit 100 rd bestrahlten Rattenblut isoliert wurden, ergaben sich keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den mit den Substanzen behandelten Tieren.

In der Kontrollgruppe ergab sich ein Anstieg in der S-Phase von 3,7 % auf 21,1 %, was eine Stimulation von 17,4 % bedeutet. Bei NSA bestand eine Differenz von 14,6 % und bei Vit. B₆ von 16,5 %. Der relativ hohe Anstieg der Synthese bei allen 3 Gruppen läßt eine Aktivierung der Proliveration zusätzlich zu PHA vermuten. Bei der Einwirkung von 100 rd können nämlich Endonukleasen aktiviert werden, die auch beim Repairprozess mitwirken. Sie machen zusätzlich spezifische Einschnitte und bewirken eine teilweise Entspiralisierung. An einigen Einschnitten kann dann eine semikonservative DNS-Synthese einsetzen.

Nach 0 Tagen haben die Substanzen die Stimulierbarkeit also in keiner Weise beeinflusst, es wird allein

die Wirkung von 100 rd deutlich.

Nach 14 Tagen sieht man bei den Kontrollen ein An-
wachsen der S-Phase von 4,2 % auf 13,7 %, was eine
Stimulation von 9,5 % bedeutet. Die Stimulierbar-
keit durch PHA ist somit gegenüber dem Kontrollwert
von 0 Tagen um 7,9 % abgesunken, mit einem signifi-
kanten Unterschied von $p = 0,01$.

Man kann hier von einer Stimulationshemmung sprechen,
die man folgendermaßen erklären könnte:

PHA wird an der Oberfläche der Zellmembran der Lympho-
zyten gebunden. Nach Bestrahlung können Globuline
entstehen, die sich an bestimmten Stellen der Lympho-
zytenoberfläche festsetzen können und dadurch die
Bindung von PHA an die Oberfläche blockieren. Folg-
lich werden weniger Lymphozyten durch PHA stimuliert.

Diese Erkenntnis entstammt der Krebsforschung, wo
bekannt ist, daß bei starkem Wachstum eines Tumors
-Globuline produziert werden, welche die Stimula-
tion von Lymphozyten vermindern. Deswegen ist bei
raschem Tumorwachstum die eigene Tumorabwehr geschwächt.

Stellt man nun an diesem Zeitpunkt zwischen den Sub-
stanzen eine Beziehung auf, nämlich 14 Tage nach
Bestrahlung, so ergibt NSA einen Zuwachs der Stimula-
tion durch PHA von 2,1 % auf 14,8 %, was eine Mehr-
stimulation von 3,2 % gegenüber den Kontrollen ergibt.
Dieser Unterschied ist nicht signifikant, also kann

nach 14 Tagen bei NSA von keinem Effekt im positiven oder negativen Sinn gesprochen werden.

Bei Gabe von Vit. B₆ zeigte sich nach 14 Tagen ein Anstieg der Stimulierbarkeit von 6,7 % gegenüber den Kontrollwerten. Der signifikante Unterschied wurde hier mit $p = 0,07$ berechnet. Man kann nur von einer leichten Verbesserung der Stimulationsfähigkeit der Lymphozyten durch Vit. B₆ sprechen.

Bei der Gruppe, die 28 Tage nach der Bestrahlung im Hinblick auf einen strahlenschützenden Effekt untersucht wurde, kann man sehen, daß eine deutliche Erholung - ein recovery Effekt - in den Lymphozyten eingetreten ist. Bei den Kontrollgruppen, die nur die 100 rd Bestrahlung erhielten, erscheint ein Anstieg der S-Phase von 4,4 % auf 25,0 %, d.h. also eine zusätzliche Stimulierbarkeit von 20,6 %. Diese Differenz zeigt einen signifikanten Anstieg gegenüber der Differenz der S-Phasen von 14 Tagen mit 11,1 %, ($p = 0,01$). Ebenfalls sieht man eine signifikante Erhöhung in der G₂-Phase von 0 Tagen (2,6 %) auf die G₂-Phase von 28 Tagen (6,7 %) mit $p = 0,05$.

Interessant ist nun, daß bei den mit NSA behandelten Tieren 28 Tage nach der Bestrahlung eine deutliche Ansammlung der Zellen in der G₂-Phase zu

sehen ist. Es erscheint eine Stimulation - die sich bereits in der Ansammlung der Zellen in der G_2 -Phase ausdrückt - bei NSA von 0,6 % auf 13,9 %. Der Anstieg der G_2 -Phase beträgt also 13,3 %, im Gegensatz zu 6,7 % bei den Kontrollen. Es scheint, daß die Zellen nicht in die Mitosephase eintreten, wahrscheinlich blockiert NSA die Mitose, wenn auch in geringem Maße. Der Unterschied gegenüber den Kontrollwerten in G_2 weist lediglich eine Signifikanz von $p = 0,05$ auf.

Dieses Phänomen zeigt sich in noch viel stärkerem Ausmaß bei den mit Vit. B_6 behandelten Kollektiven. Hier findet sich 28 Tage nach der Bestrahlung eine extrem hohe Ansammlung der Zellen in der G_2 -Phase.

Vergleicht man die Stimulationsfähigkeit - gemessen durch den G_2 -Phasenanstieg - von 20,5 % mit den Kontrollwerten von 6,7 %, so ergibt sich eine Mehrstimulation von 13,8 %, (Signifikanzniveau $p = 0,01$). Ein so hoher Wert wurde sonst nie erreicht.

Man kann eindeutig erkennen, daß die Zellen nicht fähig sind sich zu teilen, also in die Mitosephase einzutreten. Vitamin B_6 kann man auf Grund dieser Werte also keinen Schutzeffekt zusprechen, sondern eher die Möglichkeit in Betracht ziehen, Vit. B_6 als Mitoseblocker in der Strahlentherapie zur Sensibilisierung von Tumoren anzuwenden. Durch weitere Versuchsreihen könnte diese Annahme abgeklärt werden.

I ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befaßte sich mit der Frage, ob die Substanzen Nicotinsäureamid (NSA) und Vitamin B₆ auf die Stimulationsfähigkeit bestrahlter Lymphozyten einen entscheidenden Einfluß haben, und zwar im Sinne eines strahlenschützenden Effektes.

Bei 90 weiblichen Ratten wurde nach einer einmaligen 100 rd Dosis nach 0 Tagen, 14 und 28 Tagen die Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch den unspezifischen Antigenstimulus Phythämagglutinin (PHA) bei behandelten und unbehandelten Tieren geprüft.

Als Meßgröße für die Proliferationsaktivität der Zellen diente der erhöhte DNA-Gehalt. Dieser wurde mit Hilfe der Impulscytophotometrie (ICP) bestimmt. Die Ergebnisse wurden nach planimetrischer und statistischer Auswertung der Histogramme miteinander verglichen.

Als Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe zeigten sich:

1. daß nach 1 - 2 Stunden die Substanzen die Stimulierbarkeit in keiner Weise beeinflussen konnten;
2. daß 14 Tage nach der Bestrahlung durch Nicotinsäureamid (NSA) kein Anstieg der Stimulierbarkeit zu messen war, während durch Vitamin B₆ eine leichte Verbesserung der Stimulationsfähigkeit von 6,7 % ($p = 0,07$) festgestellt werden konnte.

3. daß nach 28 Tagen eine relativ schwache Ansammlung der unbehandelten Zellen in der G_2 -Phase von 6,7 % ($p = 0,05$) gemessen wurde, durch Vitamin B_6 sich jedoch eine um 13,8 % ($p = 0,01$) höhere Ansammlung in der G_2 -Phase befand.

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß Nicotinsäureamid (NSA) und Vitamin B_6 keine Verbesserung der durch Strahlen geschädigten Stimulierbarkeit von Lymphozyten herbeiführen.

Diese Akkumulation des DNA-Gehalts in der G_2 -Phase nach 28 Tagen läßt darauf schließen, daß vor allem die mit Vitamin B_6 behandelten Zellen nicht fähig sind, sich zu teilen, also in die Mitose-Phase einzutreten. Dies deutet auf eine mitoseblockierende Wirkung hin. So bekommen die Substanzen eher Bedeutung in der Tumorsensibilisierung als Mitose-Blocker, als in der Anwendung als Strahlenschutzsubstanzen während der Strahlentherapie.

J LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Chone, Glettler Auswirkungen einer einzei-
tigen u. fraktionierten Ganz-
körperbestrahlung auf Lympho-
zytenzahl, Volumenverteilung
u. zytokinetisches Verhalten
im zirkulierenden Blut.
Strahlenth. 142,3,1971, 575-585
- (2) K.Lindahl-Kissling Mechanism of PHA-Action
Exp. Cell Res. 70, (1972) 17
- (3) H.Huber Grundlagen der Lymphozyten-
kultur
Dt.Med.Wschr.91Jhrg.Nr.8, 1966
- (4) E.H.Betz Morphologische Veränderungen
des Lymphozytischen Systems
nach Bestrahlung
In: Die Strahlenwirkung auf das
Lymphsystem Hrsgb.K.H.Kärcher,
C.Streffer, Springer Verlag 1974
S.29-36
- (5) Bender, Prescott Exp. Cell Res. 27 (1962) 221
- (6) Mc.Kinney, Blood 19 (1962) 349
Stohlmann jr.,
Brecher
- (7) Cooper, Rubin Blood 25 (1965) 1014
- (8) Bach, Airschlorn Exp. Cell Res. 32 (1963) 592
- (9) Epstein, Stohlmann Blood 24 (1964) 69
- (10) H.Brannon, W.Dewey X-Irradiation of Equine Peri-
pheral Blood Lymphocytes,
Stimuated with PHA in vitro.
Rad Res. 39 (1969) 520
- (11) Flemans R.J. Nature (London) 196 (1962) 335
Quglino, Hayhoe
- (12) Makinodan T., J.Cellular Physiol.69(1967)335
Nettesheim,
Morita, Chadwich

- (13) Fliedner T.M. In: The Lymphocyte in Immunology and Haemopoiesis S.198, Hrsgb.J.M.Yoffey, London, Arnold 1968
- (14) Madl W., Kärcher K.H. Das Verhalten der PHA-stimulierten Lymphozyten im Verlauf der Nachbestrahlung bei Mammakarzinomoperierten Patientinnen. In: Krebsbehandlung als interdisziplinäre Aufgabe Hrsgb.K.H.Kärcher Springer Verlag 1975 S.296-298
- (15) Cronkite In: Das Verhalten der PHA-stimulierten Lymphozyten im Verlauf einer Nachbestrahlung bei Mammakarzinom-operierten Patientinnen (14)
- (16) Zak, Dienstbier, Rezny Early lymphopenia as biological indicator of postirradiation response. Strahlenth.144,1 (1972) 60-69
- (17) Streffer C. Strahlen-Biochemie Heidelberger Taschenbücher Bd.59/60 - Springer Verlag
- (18) Rüter, Vachel, Oldekop, Wüppen, Hilz Biochem. Z. 344 (1968) 153
- (19) D.W.van Bekkum Ciba Foundation Symposium on Ionizing Radiations and Cell Metabolism London: J A.Churchill LTD. 1956 p.77
- (20) Kärcher K.H., Madl W., Hansen A. Verhalten der PHA-induzierten Transformation von Rattenlymphozyten nach Ganzkörperbestrahlung Strahlenth.145,2(1973)203-206
- (21) Vitamins and Hormones, Vol.22, p.359 - New York, London: Academic Press 1964
- (22) Nakken K.F. The X-ray induced degradation of vitamin B₆ derivatives in solution. Strahlenth. 131 (1966) 384

- (25) Langendorff, Melching, Streffer Untersuchungen über einen biologischen Strahlenschutz. Strahlenth.114 (1961) 525-534
- (24) Mc.Farlane Amer.J.Physiol.163 (1950) 394
- (25) Streffer C. Int.J.Radiat.Biol.12 (1967) 487
- (26) Maxfield, Mellwain, Robertson Radiology 17 (1943) 383
- (27) Campi, Scala Minerva Med.2 (1949) 213
- (28) Silvermann, Kligermann, Ferlig, Ellis Radiology 66 (1956) 403
- (29) Goldfeder A. Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 67 (1948) 272
- (30) Langendorff, Melching Strahlenth. 110 (1959) 505
- (31) Langendorff, Melching, Rösler Untersuchungen über einen biol.Strahlenschutz. Strahlenth.113 (1960) 603
- (32) Bridges R., Koch R. Int.J.Radiat.Biol.3 (1961) 49
- (33) Morczek, Neumeister Behandlung der strahleninduzierten Blutbildschädigungen mit Vit.B₆
Strahlent.120 (1963) 318-404
- (34) Böhnel, Stacher Die Wirkung von Vit.B₆ bei Leukopenien
Med.Welt 1-26 (1963) 589-592
- (35) del Buono G. Radioter.Radiobiol.Fis.med.5 (1951) 216
- (36) Yamada Kl., Hayami, Sawaki J.Vitaminol.3 (1957) 209
- (37) Hartweg H., Böwing G. Strahlenth.106 (1958) 289
- (38) Rovello, Ferri Haematologica 32 (1948) 319
- (39) Shorvon L.M. Brit.J.Radiol.19 (1946) 369
- (40) Zakone G. Radiol.med.34 (1948) 84

- | | |
|---|--|
| (41) Karlson | Kurzes Lehrbuch der Biochemie
Thieme Verlag, Stuttgart 1972 |
| (42) Koch, Onderka,
Seiter | Der Einfluß verschiedener
Strahlenschutzstoffe auf die
Strahlenempfindlichkeit des
Ehrlich Ca in vitro u. in vivo.
Arzneimittelforschung 12 (1962)
265 |
| (43) Maas, Rathgen,
Künkel, Schubert | Z.Naturforschung 13b (1958) 735 |
| (44) Hilz H., Berendt H. | Die Schutzwirkung des Nicotin-
säureamids auf die strahlenbe-
dingte Schädigung der DNS-
Synthese als Zellpopulations-
problem
Zeitschrift für Krebsforschung 66,
155-164 (1964) |
| (45) Streffer C. | J.Vitaminol 14, 130 (1968) |
| (46) Maas, Schmack,
Opoku | Z.Krebsforschung 65, 261 (1963) |
| (47) Koch, Seiter | Der Einfluß des Nicotinsäure-
amids auf die Strahlenempfind-
lichkeit von Tumorzellen und
röntgenganzkörperbestrahlten
Mäusen.
Die Naturwissenschaften 48
(1961) 626 |
| (48) Ichii, Kobayashi | J.Radiat.Res.6, 17 (1965) |
| (49) Scaife J.F. | Canad.J.Biochem.41 1469 (1963) |
| (50) Whitfield, Brohee, | Prevention of Nuclear changes
in Irradiated Rat Thymocytes
by Nicotinamide.
Exp.Cell Res.36, 335-340 (1964) |
| (51) Yan de Vries,
v.Benthem, Ph.Rümke | Seperation of Viable From Non-
viable Tumor cells By Flotation
on a Ficoll-Triosil Mixture.
Transplantation Vol.15, No.4
(1973) |
| (52) Wottawa A., Klein G.,
Altmann H. | Eine Methode zur Isolierung
menschlicher u. tierischer
Lymphozyten mit Ficoll-Urografin.
Wiener klin.Wschr.86 (6) 161-163
(1974) |

- (53) Dittrich W.,
Göhde W.,
Reiffenstuhl,
Severin

Die Impulscytophotometrie
des Vaginal- und Cervicals-
mears.
Arch. Gynäk. 211, 595-616
(1971)

- (54) Sachs L.

Statistische Auswertungs-
methoden.
Springer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York,
3.Aufl. 1971

An dieser Stelle sei allen gedankt, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.H. Kärcher für die freundliche Überlassung der Themen.

Für konstruktiv-kritische Ratschläge bei der Zusammenstellung und Abfassung dieser Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. A.Fritz und Prof. Dr. K. Hochstraßer herzlich danken.

Für wertvolle Anregungen danke ich auch Herrn Dr. H. Altmann, Leiter der Instituts für Biologie, Reaktorenzentrum Seibersdorf bei Wien, wo ich den experimentellen Teil der Arbeit freundlicherweise durchführen durfte.

Herzlich bedanken möchte ich mich noch bei Frau Ficker, Leiterin der Tierhaltung des Instituts für Biologie im Reaktorenzentrum Seibersdorf, die mir durch ihre liebevolle Art viel geholfen hat.

LEBENS LAUF

Am 16.4.1951 wurde ich, Caritas Kampik, als Tochter des Dr. med. Franz Kampik, Facharzt für Chirurgie, und seiner Ehefrau Maria, geb. Starck in Dillingen/Donau geboren.

Dort legte ich nach dem Besuch der Volksschule und dem Musischen Gymnasium St. Bonaventura 1970 mein Abitur ab.

Seit dieser Zeit studiere ich an der Universität München Medizin, wo ich im Herbst 1971 das Vorphysikum und im Frühjahr 1973 das Physikum absolvierte.

Nach 2 Klinischen Semestern in Wien und 5 klinischen Semestern in München beabsichtige ich im Herbst 1976 das Staatsexamen abzulegen.

